

TFM

Diciembre 2013

**“Influencia de las condiciones tempranas de los padres en la siguiente generación:
un estudio morfofisiológico y de personalidad en el diamante mandarín**



Máster Universitario en Investigación Básica y Aplicada en Recursos Cinegéticos

Alumna: **María José González Serna**

Tutores: **Carlos Alonso Álvarez**
Ana Ángela Romero Haro

Ciudad Real, 2013



Máster Universitario en Investigación Básica y Aplicada en Recursos Cinegéticos 2012/2013

TRABAJO FIN DE MÁSTER:

**“Influencia de las condiciones tempranas de los padres en la
siguiente generación: un estudio morfofisiológico y de
personalidad en el diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*)”**

VºBº Carlos Alonso Álvarez	VºBº Ana Ángela Romero Haro	VºBº María José González Serna

RESUMEN

El fenotipo de cualquier organismo es el resultado de la interacción de su genotipo con el ambiente. Un mismo genotipo puede dar lugar a diferentes fenotipos en ambientes diferentes, lo que se conoce como plasticidad fenotípica. El ambiente experimentado durante las primeras fases de la vida es particularmente crítico, influyendo en los patrones de desarrollo, y teniendo un mayor impacto que el ambiente posterior. Los efectos de las condiciones tempranas pueden observarse a lo largo de toda la vida, e incluso transmitirse a la descendencia, si bien los mecanismos próximos de dicha transmisión son aún poco conocidos. En este estudio se pretendió comprobar en pájaros (diamantes mandarines; *Taeniopygia guttata*) si el ambiente experimentado durante el desarrollo determina rasgos morfológicos, fisiológicos y de personalidad de la progenie. Ambientes parentales adversos podrían acarrear costes en la descendencia, o bien favorecer la aparición de adaptaciones a las condiciones adversas experimentadas por los padres (“acomodación”). Para ello se manipuló el número de hermanos durante el crecimiento: más o menos hermanos, implicarían condiciones adversas o propicias durante el desarrollo, respectivamente. Se realizó una reproducción con dichos individuos, ya adultos. Los descendientes hembra de ambiente parental adverso mostraron un menor daño oxidativo a los pocos días de vida. Después, machos y hembras de ese mismo grupo ganaron más peso durante el desarrollo, y posteriormente, ya como adultos, consiguieron un mayor peso y condición física (peso corregido por tamaño). Esos mismos adultos también mostraban señales sexuales más intensas (picos más rojos), el efecto en este caso, siendo nuevamente más fuerte en las hembras. Por último, dichas hembras mostraron menor audacia (menor inmovilidad) durante una manipulación. Se sugiere que los padres habrían primado la inversión en reproducción temprana en todas las aves, más en las hijas, a expensas de un comportamiento de evitar predadores (supervivencia). La eficacia biológica del nuevo fenotipo dependería del ambiente que se encontrara durante su vida, el resultado del ajuste siendo, tal vez, subóptimo en las condiciones de abundancia de recursos asociadas a la cautividad.

PALABRAS CLAVE: Ambiente temprano, efectos parentales, compensación, estrés oxidativo, perfiles fenotípicos, personalidad, plasticidad fenotípica

1. INTRODUCCIÓN

El fenotipo de un organismo es el resultado de la interacción de la genética y el ambiente. Un mismo individuo puede dar lugar a distintos fenotipos a partir de un mismo genotipo como resultado de dicha interacción. Esto es lo que se conoce como plasticidad fenotípica (West-Eberhard 2003). El impacto del ambiente sobre el fenotipo es mayor cuando se produce durante el desarrollo a edades tempranas ya que aún no se ha establecido el “*modus operandi*” del organismo (Metcalf & Monaghan 2001; West-Eberhard 2003). Dicho impacto temprano puede seguir afectando al fenotipo a lo largo de toda la historia de vida del individuo (p.ej. Alonso-Álvarez et al. 2006; Noguera et al. 2011). Además, hay numerosas evidencias de que dichos efectos incluso afectan a varias generaciones, probablemente a través de cambios epigenéticos, es decir, sin mutaciones que alteren la secuencia del ADN (Crews et al 2007; Velando et al. 2008).

Las condiciones ambientales adversas durante el desarrollo pueden tener consecuencias negativas a largo plazo (p.ej. Auer 2010), pero también dar lugar a respuestas compensatorias que, aunque beneficiosas a corto plazo (p.ej. anticipar la primera reproducción), podrían ser costosas en términos de eficacia biológica (contribución de toda tu descendencia a la población). Dicho coste se podría pagar, por ejemplo, con una disminución de la longevidad (Metcalf & Monaghan 2001; Monaghan et al. 2011), o también con una reducción de la calidad de los descendientes (p.ej. Naguib et al. 2006; Alonso-Álvarez et al 2007c). Las estrategias de compensación están así determinadas por la naturaleza de sus costes, el plazo en el que hay que pagarlos y los mecanismos subyacentes a los mismos.

Uno de los mecanismos próximos asociados al efecto de las condiciones de desarrollo adversas es el estrés oxidativo. El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO) que produce el organismo, como resultado de la respiración celular o de agentes externos (contaminantes), y el estado del sistema de defensa antioxidante, a favor del primero (Finkel & Holbrook 2000; Halliwell & Gutteridge 2007). Este desequilibrio se traduce en daño oxidativo en las principales moléculas orgánicas (lípidos, proteínas y ADN; Halliwell & Gutteridge 2007). El estrés oxidativo tendría un mayor impacto en edades tempranas porque alteraría patrones de desarrollo del organismo, porque las defensas antioxidantes pueden no haberse construido

todavía, y porque el propio desarrollo aumentaría el metabolismo y con ello la producción de moléculas oxidantes (Metcalf & Monaghan 2001; Monaghan et al. 2009; Metcalf & Alonso-Alvarez 2010). También se ha sugerido que el estrés oxidativo sería un coste del crecimiento acelerado (compensatorio) tras un evento de escasez de recursos (Metcalf & Monaghan 2001; Alonso-Álvarez et al 2007c Func Ecol; Monaghan et al. 2009). Sin embargo, el estudio del estrés oxidativo y su repercusión en las estrategias vitales ha empezado a captar el interés de los investigadores solo recientemente (Dowling & Simmons 2009; Metcalf & Alonso-Alvarez 2010), y solo recientemente se ha comenzado a especular y a explorar en mamíferos modelo si las consecuencias de las condiciones de desarrollo adversas pueden afectar al estrés oxidativo de las siguientes generaciones (Torrens et al 2008; Ponzio et al 2012).

Hasta aquí hemos descrito que un ambiente adverso puede tener efectos negativos sobre el fenotipo que pueden ser compensados o no, a determinados costes. Los padres, sin embargo, pueden interferir en los efectos ambientales, manipulando el ambiente temprano de los hijos en lo que se conoce como efectos parentales (Mousseau & Fox 1998; Maestriperi & Mateo 2009). Estos efectos ocurren cuando el fenotipo de un individuo viene determinado no sólo por su propio genotipo y las condiciones ambientales que experimenta durante su desarrollo, sino también por el fenotipo y las condiciones ambientales en las que se desarrollaron sus padres. Los padres podrían crear cambios fenotípicos en su descendencia (p.ej. alternado el nivel de hormonas y antioxidantes en el huevo; Royle et al 2001) que incrementarían su eficacia biológica en ambientes particulares. Este fenómeno es conocido como “*acomodación fenotípica*” (West-Eberhard 2003). Los efectos parentales, por lo tanto, prepararían a la descendencia para las condiciones ambientales probables que encontrarán durante su vida, es decir, las mismas condiciones en las que se desarrollaron estos mismos padres, por lo que los efectos podrían considerarse adaptativos (Monaghan 2008, Shimada et al. 2010).

Está ampliamente demostrado que la personalidad está influenciada por las condiciones ambientales presentes durante el desarrollo, y por los efectos maternos, existiendo numerosos trabajos que lo demuestran en mamíferos y aves (Fox & Millam, 2004; Ruuskanen & Laaksonen 2010; Rodel & Meyer 2011; Schoech et al. 2012) incluyendo el diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*;

Tobler & Sandell 2007), objeto del presente estudio. La personalidad se refiere a las diferencias en el comportamiento individual que son consistentes en el tiempo y a través de las situaciones (revisión de Réale et al. 2007 y Carter et al. 2013). Consistente no significa que el rasgo no pueda cambiar con la edad o con las condiciones ambientales, sino que las diferencias entre individuos se mantienen (revisión de Stamps & Groothuis 2010). Los rasgos de la personalidad son hereditarios (p.ej. Drent et al 2003), están afectados por la herencia epigenética (revisión en Ledon-Rettig et al 2013) y el ambiente temprano (arriba), y además, se vinculan a la condición física y a la eficacia biológica del individuo (supervivencia y reproducción; Smith & Blumstein 2008). La personalidad ha sido, por tanto, objeto de estudio en muchos campos: producción y bienestar animal, biología de la conservación, predicción de riesgos de enfermedad, farmacología y psicología, además de en evolución y ecología. De hecho la personalidad puede afectar de forma importante a procesos ecológicos como la expansión del nicho, la dispersión o la organización social (Réale et al. 2007; Wolf & Weissing 2012).

La influencia directa del ambiente temprano o de los efectos parentales sobre el fenotipo se podría ejercer sobre caracteres concretos (morfológicos, fisiológicos o de personalidad), o bien, sobre un conjunto de ellos. En este sentido, podríamos hablar de síndrome o perfil fenotípico, cuando varios rasgos están asociados (correlacionados) en su expresión (ver Pigliucci 2003; Sih et al 2004, 2011). Dicha covariación supone un limitante al proceso evolutivo sobre un rasgo solo, pero también es seleccionada en tanto en cuanto favorece la eficacia biológica del individuo (West-Eberhard 2003; Sih et al 2011). El origen de esta idea vendría del concepto de síndrome de comportamiento (revisión en Sih et al 2011), donde diferentes rasgos de personalidad (p.ej. agresividad, actividad, timidez) covarían de manera conjunta ante diferentes situaciones unas veces en un sentido, y otras en otro (Sih et al 2011).

En este trabajo se pretendió comprobar la hipótesis de que las condiciones sufridas durante el desarrollo temprano en una generación pueden afectar a diferentes rasgos fenotípicos de la siguiente generación. Además, predecimos que dichas condiciones tempranas pueden afectar al perfil fenotípico de los descendientes, es decir, a la covariación entre variables fenotípicas, lo cual en última instancia podría afectar a la eficacia biológica de los individuos. En este estudio se trabajó con diamantes mandarines. Ésta es una especie muy utilizada

en investigación ya que madura rápidamente, es sexualmente dimórfica, tiene una compleja variedad de comportamientos, y crían continuamente en condiciones apropiadas en cautividad (Zann 1996; Alonso-Álvarez et al. 2006). Estas aves poseen picos cuyo color (naranja-rojo) es producido por pigmentos antioxidantes (i.e. carotenoides; McGraw et al. 2010), y el cual es seleccionado durante la elección de pareja, tanto por los machos como por las hembras (Burley & Coopersmith 1987; Griffith & Buchanan 2010; Simons & Verhulst 2011). Además, estas aves son ampliamente utilizadas en estudios de ecología de comportamiento y, más concretamente, de personalidad (e.g. Herborn et al. 2011; Morgan et al. 2012; Mainwaring & Hartley 2013). Se han analizado un buen número de caracteres, como el crecimiento, peso, tamaño, caracteres fisiológicos como los niveles de antioxidantes o el nivel de daño oxidativo en sangre, caracteres vinculados al éxito de emparejamiento como el color del pico, y por último caracteres de personalidad, todos ellos habiendo sido asociados de algún modo, de manera independiente, con la supervivencia y la reproducción en aves.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Contextualización

El trabajo que ocupa este TFM se encuentra enmarcado dentro de una serie de estudios de historia de vida con diamante mandarín.

El estudio está enfocado en la tercera generación filial (F3) de una población de diamante mandarín. Los progenitores de la generación de estudio (F2) fueron sometidos a intercambio de pollos entre nidos (*cross-fostering*), criándose en ambientes propicios desde el punto de vista de la competencia (es decir, ambiente reducido: con menos hermanos) o bien en ambientes adversos (ambiente aumentado: más hermanos). Todos los pollos fueron intercambiados cuando tenían de 0 a 2 días de vida, y ningún pollo permanecía en su nido, de forma que todos los pollos tenían padres adoptivos y genéticos. Además, los hermanos de un nido original eran distribuidos de manera equilibrada entre nidos aumentados y reducidos de adopción.

El aumento del tamaño de nidada es un procedimiento clásico en los estudios sobre el coste de la reproducción en aves y ha mostrado efectos negativos a largo plazo sobre la descendencia. En particular, en el diamante

mandarín se ha mostrado que los pollos criados en nidadas aumentadas crecían más despacio, conseguían menor peso y tamaño de adultos, un color del pico más pálido, deficiencias en el canto y en la respuesta inmune, una mayor tasa metabólica e incluso una menor resistencia al estrés (revisión en Griffith & Buchanan 2010; ver más recientemente De Coster et al. 2011).

Los progenitores de sus padres (F1) fueron tratados con butionina sufloximina (BSO; Sigma, B2640), un aminoácido sintético que bloquea la enzima gamma-glutamylcisteína sintetasa, encargada de la síntesis de glutatión, un importante antioxidante intracelular. Los progenitores de esta F1 eran de fenotipo silvestre y se obtuvieron de cinco proveedores diferentes para aumentar la diversidad genética (Figura 1).

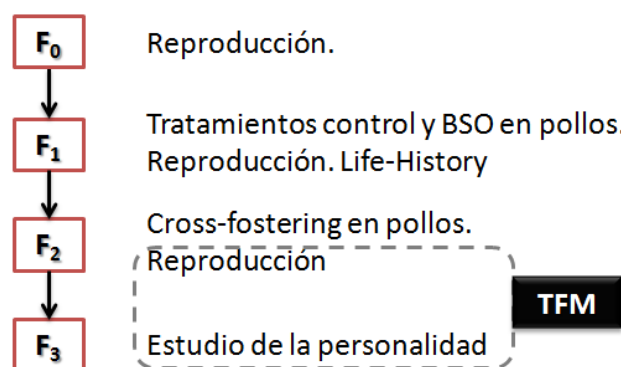


Figura 1: Resumen gráfico del marco del TFM y de los estudios realizados en las diferentes generaciones de diamante mandarín.

2.2. Protocolo experimental de la reproducción de la F2

El aviario estaba ubicado en la Finca Dehesa Galiana, situada en el Km 13.2 de la carretera de Piedrabuena (Ciudad Real). A partir del viernes 22 de febrero de 2013 se empezaron a estudiar 70 parejas que criaron durante cuatro meses.

El aviario lo forman dos habitaciones de 2.80 m de ancho, 3 m de largo y 2.50 m de alto, de 35 jaulas de reproducción cada una, siendo un total de 70 jaulas. Cada jaula del aviario medía 0,60 x 0,40 x 0,40 m (Italgabbie, Caltrano, Italia) y contenía a una pareja de pájaros. Ambas habitaciones se mantuvieron a una temperatura de entre 22°C y 25°C, con un ciclo de luz:oscuridad 16:8, con encendidos de luces a las 7 horas. Para cada habitación, la luz se obtenía de una bombilla de bajo consumo convencional (Osram 23 W) y de cuatro bombillas que

proporcionaban, además de luz convencional, luz ultravioleta (REPTI-UV R81085, 26W UVB 10.0) que imita la luz solar, para fomentar la reproducción. A cada jaula se le añadió una caja nido de 11 x 13 x 13 cm.

Los pájaros dispusieron de agua y comida *ad libitum* durante todo el experimento, así como de grit (suplemento de calcio) y pasta de cría (Pilesan 100 10810). El pienso consistía en una mezcla de mijos (VINCI, Valencia, España) en una proporción de 2/3 y alpiste 1/3 (VINCI, Valencia, España). Durante el periodo de construcción de los nidos, las aves disponían de fibra de coco (Pet's Products; Holanda) *ad libitum*.

Las parejas reproductoras tuvieron el mismo tratamiento durante su desarrollo (ambos progenitores crecieron en ambiente adverso o ambiente propicio). Se optó por esta distribución para aumentar la potencia estadística del experimento, evitando la interacción entre sexo y ambiente. Los padres (F2) no eran hermanos, ni adoptivos ni biológicos (ver *cross-fostering*). Además, las jaulas con los diferentes tratamientos se distribuyeron al azar dentro de la habitación y entre las dos habitaciones. Por lo tanto, nuestros individuos de la F3 se dividen en dos tratamientos: ambiente parental adverso, aquellos cuyos ambos padres crecieron en nidadas con un número de pollos mayor al nacido de forma natural, y ambiente parental propicio, los padres crecieron en un nido cuyo número de pollos era menor al producido de manera natural.

Se realizaron revisiones tres días a la semana (lunes, miércoles y viernes). Se registró el día de nacimiento de los pollos F3, y en su duodécimo día (± 3 días) se realizó una extracción de sangre de la vena braquial mediante dos capilares heparinizados de 75 μ L (Figura 2). También se registró el peso (± 0.1 g) y tarso (± 0.01 mm) de cada una de las aves, y por último, fueron marcados con anillas de aluminio para su identificación individual mediante un código numérico. En total nacieron 264 pollos de los cuales llegaron 238 al momento de la primera extracción de sangre.

Cuando todos los pollos habían saltado de la caja nido, ésta se les retiró para impedir un segundo intento de reproducción de sus padres, que afectara al desarrollo de los pollos. Las cajas nido se empezaron a quitar el día 5 de Abril de 2013.

Entre los días 36 y 42 después de la eclosión (edad de independencia; Figura 2), se volvió a registrar el peso (± 0.1 g) y tarso (± 0.01 mm) así como el

sexo, y los pájaros se trasladaron a dos habitaciones (2 m ancho, 2.80 m largo y 2.50 m alto), una para machos y otra para hembras. A esta edad ya son independientes y es posible identificar el sexo (Zann, 1996). En las habitaciones disponían de agua y comida *ad libitum*. La luz provenía de dos bombillas (Osram 23 W) con un ciclo de luz:oscuridad de 13:11, con encendido de luces a las 8 horas. Además, disponían de un radiador para mantener la temperatura entre 22 y 25°C, durante los días que fue necesario. A la edad de la independencia permanecían vivos un total de 236 individuos.

El último pollo se trasladó a las habitaciones el 17 de junio de 2013. En total la etapa de cría duró cuatro meses aproximadamente. El estudio de reproducción de la F2 se detuvo en esa fecha ya que se había conseguido un éxito de cría del 91.42% (64 de las 70 parejas).

Se volvió a sacar sangre a las aves el día 21 de agosto de 2013 cuando tenían 123 de vida de promedio (rango: 87-160; Figura 2), y todas las características fenotípicas estaban desarrolladas completamente. Se ha visto que estas aves pueden reproducirse a partir de los 60 días de edad (Zann, 1996; Alonso-Álvarez et al, 2006). Esta vez se extrajo sangre de la yugular con jeringas heparinizadas para conseguir un mayor volumen de muestra, obteniéndose 150µL de sangre aproximadamente. En esta misma manipulación se midió también la coloración roja del pico mediante un espectrofotómetro portátil (Minolta 2600d) y volvió a medirse el peso ($\pm 0.1g$) y tarso ($\pm 0.01mm$) de un total de 226 individuos.

La sangre obtenida durante todo el estudio se guardó a 6°C aprox. durante un periodo máximo de 2-3 horas tras la extracción. Ésta, tanto de los pollos como de los mismos pollos ya adultos, se centrifugó a 5000g durante 5 minutos a una temperatura de 6°C. Una vez centrifugados, se separó la fracción celular y el plasma. Todas las muestras se congelaron a -80°C hasta las posteriores pruebas de laboratorio.

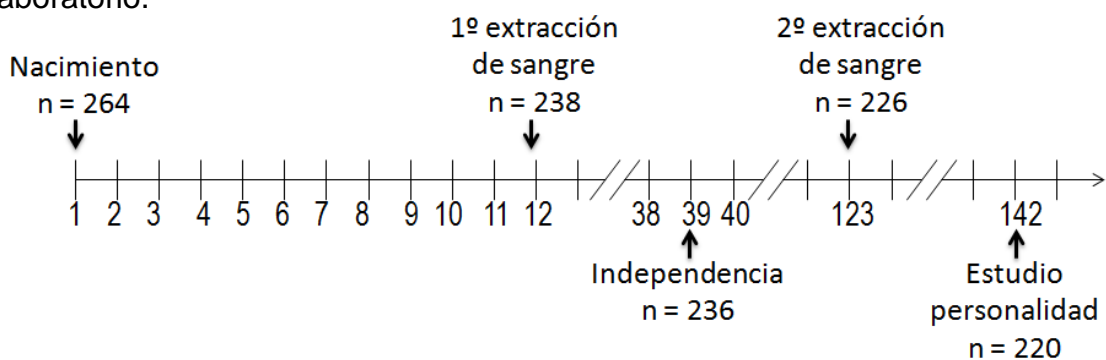


Figura 2: Cronograma por días promedio del seguimiento de las aves F3.

2.3. Personalidad

Previamente a la realización de las pruebas de personalidad en las aves F3 se realizó un estudio piloto para establecer un diseño experimental consistente y repetible.

El estudio piloto se realizó sobre pájaros F2 ($n=40$) provenientes de ambientes aumentados y reducidos desde 25 de Junio de 2013 al 11 de Julio de 2013. Se formaron grupos de cuatro pájaros del mismo sexo por jaula y se tomó medida del orden de captura, frecuencia respiratoria, picoteo tocando el pico, picoteo sin tocar el pico, inmovilidad tónica, “*emergence test*” o salida a espacio abierto (se colocó al pájaro dentro de una caja de 12 cm de ancho, 10 cm de largo, 7 cm de alto y el diámetro del círculo de salida fue de 4.5 cm; y a los 10 segundos se abrió una ventana por la que podía salir a un espacio abierto, teniendo un tiempo máximo de 10 minutos para salir), nerviosismo/movimiento (valores de 0 para los más tranquilos en escala ascendente hasta 3 para los más nerviosos) y agresividad (ver explicación más adelante). El orden de las pruebas de picoteo, inmovilidad y emergencia se realizó al azar para decidir el orden en el protocolo definitivo. Entre una medida y otra los pájaros permanecieron separados de uno en uno en bolsas de algodón blanco numeradas. Se realizaron dos repeticiones completas de las pruebas en todos los individuos con un intervalo de dos semanas entre ellas para analizar la repetibilidad total (Lessells & Boag 1987): Orden de captura: $r = -0.22$, $p = 0.173$; frecuencia respiratoria: $r = 0.64$, $p < 0.001$; picoteo tocando pico: $r = 0.46$, $p = 0.001$; picoteo sin tocar pico: $r = 0.49$, $p < 0.001$; inmovilidad tónica: $r = 0.49$, $p = 0.005$; nerviosismo: $r = 0.27$, $p = 0.043$; agresividad: $r = 0.53$, $p < 0.001$). El test de emergencia no llegó a realizarse en todos los individuos del experimento piloto ya que solo 10 de 24 animales que se analizaron hasta el momento realizaron la prueba correctamente. Por el poco éxito en los resultados y la cantidad de tiempo utilizado en esta prueba se descartó en mitad del experimento piloto. El orden definitivo (explicado más adelante) fue escogido analizando las repetibilidades de una prueba según su orden con respecto a las demás.

Las pruebas de personalidad definitivas en los F3 se realizaron entre 106 y 209 días de edad (Figura 2). Los pájaros dispusieron de agua, comida y grit *ad libitum* durante todo el experimento. Se distribuyeron en grupos de 4 animales del mismo sexo por jaula (se usó el mismo aviario que en la reproducción de los F2,

ver características del aviario arriba) ($n=220$). El número de aves por jaula fue el resultado, por un lado, de limitaciones logísticas, y por otro de experiencias previas donde observamos que esas densidades no afectaban a la salud de las aves. Los pájaros fueron colocados en las jaulas 3 semanas antes del inicio de las pruebas para que se adaptaran al nuevo ambiente (Morgan et al. 2012). Se controló la distribución de los grupos (A= ambiente parental aumentado; R= ambiente parental reducido) de los cuatro individuos dentro de las jaulas, de manera que quedaron 18 jaulas ARRR, 17 jaulas RAAA, 19 jaulas AARR y una jaula AAAA. Se hicieron dos repeticiones completas (dos bloques de tests) de las pruebas de personalidad con un intervalo de dos semanas entre ellas para analizar la repetibilidad y aumentar la potencia estadística.

Las pruebas se realizaron entre las 9.00 y las 16.00 (Fucikova et al. 2009). El orden en el que se realizaron las medidas a los individuos fue al azar en la primera repetición, y se usó el mismo orden en la segunda repetición. Las medidas de personalidad tomadas fueron las siguientes, por orden: orden de captura, frecuencia respiratoria, picoteo, inmovilidad tónica, jerarquía y agresividad (Figura 3).

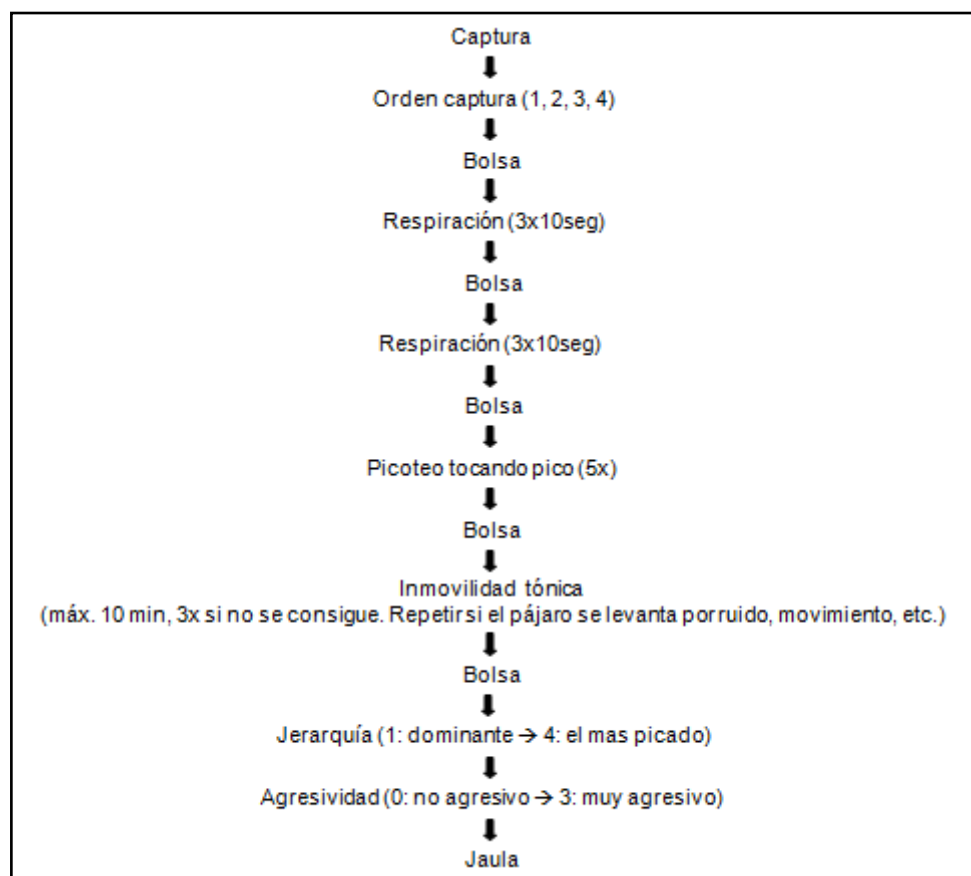


Figura 3: Resumen del protocolo que se utilizó en el estudio de personalidad de los pájaros F3.

El orden de captura se anotó conforme se fueron cogiendo los pájaros de la jaula ($r=0.19$, $p=0.001$), al estar en grupos de cuatro esta variable tuvo cuatro valores. Los individuos se metieron en bolsas de algodón blanco numeradas de forma individual. Acto seguido, se llevaron a una habitación contigua al aviario (2.80 m ancho, 3 m largo y 2.50 m alto), donde se realizaron las demás pruebas.

La frecuencia respiratoria se realizó según el orden de captura. Se sujetó el pájaro con la mano izquierda, con la cabeza entre el dedo índice y el dedo corazón, y tumbados boca arriba (Fucikova et al. 2009). Se contó el número de movimientos del pecho durante un minuto en total, en dos tandas de tres medidas de 10 segundos cada una. Las dos tandas se separaron metiendo el pájaro en su bolsa el tiempo que se tardaba en realizar las medidas de respiración de sus compañeros de jaula. La repetibilidad de esta prueba entre todos los registros (dos bloques y cuatro tandas) fue elevada ($r=0.75$, $p<0.001$).

La primera medida de agresividad se tomó contando los intentos de picoteo hacia un objeto acercándose. De nuevo se realizó la prueba de uno en uno y por orden de captura. Se sujetaron los individuos con las patas entre el dedo índice y el dedo corazón, quedando el pájaro en posición vertical por encima de la mano. El foco de luz quedaba detrás del pájaro. Se les acercó cinco veces el dedo índice de la mano contraria a la que los sujetaba desde una distancia constante de 20 cm. En todas las ocasiones se tocó el pico del pájaro con el dedo (Imagen 1). La repetibilidad de esta prueba entre los dos bloques fue elevada ($r=0.68$, $p<0.001$).



Imagen 1: Fotografía de un pájaro F3 en el momento del picoteo.

Para la inmovilidad tónica se utilizó el método descrito por Jones & Faure (1981), Jones (1986) y Van den Brink et al. (2012a). De nuevo se sacaron los pájaros de la bolsa de uno en uno y por orden de captura. Después, se

introdujeron en una jaula de 60 cm de ancho, 28 cm de largo y 27 cm de alto y se les tumbó boca arriba encima de un soporte de plástico cuadrado gris de 20 cm de lado. Se colocó una malla de sombreo entre la jaula y el manipulador para que el pájaro no tuviera contacto visual con este. Los pájaros siempre se colocaron en el mismo sitio y se sujetaron de la misma forma: la cabeza con los dedos índice y pulgar de la mano izquierda, y las patas y cola con la mano derecha (las manos del manipulador se introducían en la jaula por dos ventanas). Una vez colocados los pájaros, se les soltó y el manipulador permanecía con las manos y brazos inmóviles dentro de la jaula (Imagen 2). Se registró el tiempo desde que el pájaro se dejó de sujetar hasta que se levantó. Se consideró que llegaban a la inmovilización tónica si permanecían más de 12 segundos tumbados. Si el ave se mantenía menos de 12 segundos una vez había sido soltado se realizaron dos intentos más como máximo (Van den Brink et al. 2012b). Se estableció un máximo de tiempo de inmovilidad de 10 minutos por pájaro. Una vez pasados estos 10 minutos, se daba por terminaba la prueba. Después los pájaros se introdujeron de nuevo en las bolsas de algodón y se soltaron en su jaula del aviario. La repetibilidad entre los dos bloques de esta prueba fue significativa ($r=0.34$, $p<0.001$).



Imagen 2: Fotografías de un pájaro F3 en el momento de la inmovilidad tónica.

Observamos que entre las aves de cada jaula existían individuos que mostraban pérdida de plumas, probablemente consecuencia de interacciones agonísticas. Dicha circunstancia no había sido detectada en el pasado en el aviario. Sin embargo, decidimos aprovechar la circunstancia para atribuir un orden jerárquico a las aves de cada jaula. Este orden se estimó mediante una escala de

uno a cuatro, basándose en el porcentaje de desplume de los pájaros. Las zonas más desplumadas fueron la zona que rodea la cola, el pecho, la parte de atrás de la cabeza, y en el caso de los machos, los flancos de los machos. La escala fue como sigue: pájaros intactos (1), 5-15% de superficie corporal desplumada (2), 15-30% (3), más de un 30% (4). La repetibilidad entre bloques de esta medida fue elevada ($r=0.66$, $p<0.001$). Ningún pájaro murió durante el estudio de personalidad, y las aves recuperaron su plumaje en un mes.

Por último, se anotó el valor de agresividad con una escala de cero a tres, basándonos en el protocolo de Van den Brink et al. (2012b). El cero se asignó a pájaros que no expresaron ningún comportamiento agresivo durante todas las pruebas, el valor de uno a aquellos que intentaron picar una o pocas veces sin gran intención de hacerlo, la puntuación de dos fue para aquellos que frecuentemente intentaron picar y atacar, y el tres a aquellos que fueron extremadamente agresivos (intentaron picar en todas las ocasiones y realizaron posiciones de ataque: alas levantadas, el pico abierto y plumaje erizado). Esta medida tuvo una repetibilidad elevada ($r=0.66$, $p<0.001$).

Para evitar variaciones subjetivas por parte del observador los valores de jerarquía y agresividad fueron asignados siempre por la misma persona.

2.4. Determinación de carotenos totales en plasma

Se siguió la técnica descrita por Hargitai et al. (2009) con modificaciones debido al pequeño volumen de plasma en las muestras de las aves.

Se partió de alícuotas de plasma (5 μ L) que se diluyeron en etanol (1:10) en tubos de 0,6 mL. Los tubos se agitaron en vórtex durante 3 minutos para homogenizar las muestras. La proteína floculante se precipitó por centrifugación a 1500g durante 10 minutos a 4°C. La absorbancia del sobrenadante se determinó a 446nm en un dispositivo lector de microplacas Biotek (PowerWave XS2, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski VT). Una curva estándar de luteína con siete puntos (Sigma) se utilizó para la cuantificación de carotenoides totales. La repetibilidad se calculó a partir de duplicados en una submuestra ($r=0,87$, $p<0,001$, $n=26$).

2.5. Antioxidantes en plasma

La técnica comúnmente llamada TAS (cuyo significado en inglés es *Total Antioxidant Status*) se utilizó para estimar la disponibilidad de los antioxidantes no enzimáticos en plasma. Se siguió la técnica descrita por Cohen et al. (2007) una su vez adaptada de Miller et al. (1993).

El estándar se preparó disolviendo un derivado de α -tocoferol soluble en agua, Trolox (Aldrich), en tampón PBS a 1,2mM. La metamioglobina fue generada mediante la mezcla de volúmenes iguales de 400 μ M de mioglobina (a partir de músculo esquelético equino, Sigma) y 740 μ M ferricianato de potasio, a continuación se pasó la mezcla a través de una columna de Sephadex (G15-120, Sigma). El cromógeno, 2,2'-azino-bis-(3-ácido etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, Sigma), se mezcló en un tampón de 153 μ M. El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos en un lector de Bio-Tek (Power Wave XS2, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT), la temperatura se mantuvo a 37°C, y las lecturas se realizaron a 734 nm. Cinco μ L de estándar (Trolox), de blanco (sólo PBS) y de las muestras se pusieron por separado en los pocillos. A continuación, se añadieron secuencialmente 15 μ L de metmioglobina y 250 μ L de ABTS a cada pocillo. Se utilizó una pipeta multicanal para añadir simultáneamente 50 μ L de 200 μ M de H₂O₂ a todos los pocillos, empezando así la reacción.. Lo que usamos como estimador de la capacidad antioxidante de la muestra es el tiempo que tarda el ABTS (transparente) en oxidarse y pasar a ABTS+ (verde), lo cual se evidencia por un claro aumento de la absorbancia (cuanto mayor es la capacidad antioxidante de la muestra, más tarda en comenzar el aumento de absorbancia). Todas las muestras fueron evaluadas dos veces y produjeron altas repetibilidades ($r=0.86$, $p<0.0001$, $n=238$).

2.6. Determinación del Ácido Úrico y Triglicéridos en plasma

Los triglicéridos y los niveles de ácido úrico se evaluaron en 5 μ L de plasma cada uno, usando un lector de microplacas Bio-Tek (PowerWave XS2, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski VT) fijado a 505 nm y 520 nm, respectivamente. Se utilizaron el método de oxidasa/peroxidasa de glicerol fosfato y el método uricasa/peroxidasa para medir los niveles de triglicéridos y ácido úrico respectivamente (kits de Biosystems, Barcelona, España). Una submuestra de

n=45 fue evaluada dos veces produciendo repetibilidades altas (Triglicéridos: $r=0.94$, $p<0.001$; ácido úrico: $r=0.99$, $p<0.001$).

2.7. Determinación de Malondialdehído

El Malondialdehído (MDA), es un producto de la rotura de lípidos polinsaturados oxidados, por lo que es un marcador de daño oxidativo en estas moléculas. Se siguió la técnica descrita por Agarwal & Chase (2002) con las modificaciones descritas en Nussey et al. (2009). Con esta técnica se mide la espectrofluorimetría del complejo rojo formado por el MDA y el TBA (ácido 2-tiobarbitúrico).

Para la calibración se realizó una recta con diferentes diluciones seriadas de TEP (1,1,3,3,-tetraetoxipropano, SIGMA) diluido en etanol al 40%. A las muestras y la recta se añadió 50 μL de BHT (butil-hidroxi-tolueno) 0.05%, 120 μL de H_3PO_4 0.44 M y 30 μL TBA 42 mM y se mezcló todo durante 5 segundos mediante agitación. Las muestras se calentaron a 100°C en bloque seco durante 1 hora para la formación de complejos MDA-TBA. Se paró la reacción pinchando las muestras en hielo durante 5 minutos. Se añadió 75 μL de n-butanol para extraer en complejo MDA-TBA. Se homogeneizaron las muestras durante 1 minuto mediante agitación y después se centrifugaron a 18001 G a 4°C durante 3 minutos para separar las fases. Se tomaron 50 μL de la fase superior y se pasaron a un vial para su análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC; Agilent 1100 Series) con detector diodo array (DAD). Las muestras se saturaron previamente de N_2 para evitar oxidación. En el sistema HPLC (Agilent 1100 Series) se usó una columna ODS-2, C-18 (5 μ , 4.0 x 250 mm), mantenida a 37°C. La fase móvil fue KH_2PO_4 50 mM: MeOH (60:40 v/v), sistema de elución isocrático durante 10 minutos.

Las muestras se leen usando un detector fluorescente a una longitud de onda de excitación de 515 y de emisión de 553. Una submuestra fue evaluada dos veces produciendo repetibilidades muy altas, dentro de la misma sesión ($r=0.97$, $p<0.001$, $n=20$) y entre sesiones ($r=0.98$, $p<0.001$, $n=20$).

2.8. Resistencia al estrés oxidativo en eritrocitos (KRL)

Para la determinación de la resistencia al estrés oxidativo de los eritrocitos se siguió el método descrito por numerosos autores (p.ej. Chiu et al. 1982; Miki et al 1987; Pieri et al. 1996) con ciertas modificaciones adaptándolo a la sangre de las aves (Alonso-Álvarez et al. 2004, 2006).

La preparación de las muestras se hace con 10 μ L de sangre recién extraída de las aves adultas que se diluyeron en 365 μ L de tampón salino (4mM KHCO_3 , 2mM CaCl_2 2 H_2O , 20mM NaHCO_3 , 138mM NaCl y 2mM KCl , pH ajustado a 7.4 con 3N HCl). Se añadieron 80 μ L de esta solución por pocillo de placa ELISA. Después se añadieron 136 μ L de 150 mM AAPH (2,2'-azobis-amidinopropano-hidroclorido) por pocillo. La placa se incubó inmediatamente a 40°C en el Lector Biotek Power Wave XS2, durante 2 horas, con lecturas de densidad óptica cada 2 minutos a 540 nm, con una agitación inicial de 1 minuto a nivel medio.

Esta técnica mide la resistencia al estrés oxidativo como el tiempo necesario para hemolizar el 50% de los eritrocitos expuestos a radicales libres. Se testa la capacidad de estas células de resistir a la producción estandarizada de radicales libres generada por la descomposición del AAPH. Las defensas antioxidantes extracelulares e intracelulares contribuyen para mantener la integridad de la membrana y la función de los eritrocitos durante la lisis celular (Stocker et al. 2003; Alonso-Álvarez et al. 2004, 2006). Los datos obtenidos se graficaron. La curva (Figura 4) muestra un descenso que comienza cuando los eritrocitos se empiezan a lizar y termina cuando todos están rotos. Después la curva empieza a subir como consecuencia del acúmulo de células en el fondo del pocillo. Se tomaron el tiempo y absorbancia del punto más alto antes del descenso y del punto más bajo después del mismo. Se calculó el tiempo de retraso en el inicio del descenso (Lag time) y el tiempo a la mitad de dicho descenso, usando como tiempo cero el punto más alto antes del inicio del descenso. La repetibilidad se calculó a partir de duplicados homogeneizado en una submuestra ($r=0.84$, $p<0.001$, $n=43$).

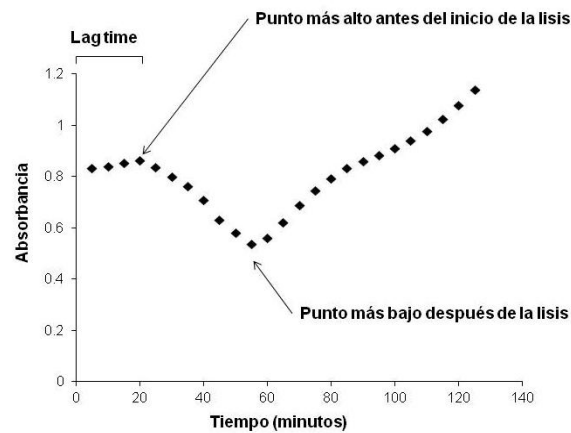


Figura 4: Gráfica creada a partir de los datos de resistencia al estrés oxidativo en eritrocitos.

2.9. Medición de color

El color a la edad de madurez sexual fue analizado mediante tres medidas repetidas hechas con un espectrofotómetro portátil (Minolta 2600d) sobre la superficie más elevada de la mandíbula superior. El colorímetro obtiene la $L^* a^* b^*$ (espacio de color CIELAB; Commission Internationale de l'éclairage L a b) y a partir de ella se calculó la intensidad de color rojo (hue invertido) a partir de la fórmula:

$$\text{hue} = [\arctan(b/a) + k\pi/2] / (2\pi)$$

En ella $k = 0$, ya que $a > 0$ y $b > 0$. Ya que las medidas triplicadas fueron repetibles ($r=0.97$, $p<0.001$, $n=226$) el valor promedio para cada individuo fue usado en los análisis estadísticos posteriores.

2.10. Nota ética

Todo este estudio cumplió con las recomendaciones de la Unión Europea y de las leyes Españolas y su diseño contó con la aprobación del Comité de Ética en Experimentación Animal de la UCLM (número de registro 1201_08).

2.11. Estadística

Para comprobar el efecto del ambiente en el que se criaron los padres de las aves F3 sobre el crecimiento (ganancia de peso y aumento de tarso) y la condición corporal, se realizaron diferentes modelos mixtos generalizados con el

software SAS 8 (SAS Systems 2006; Littell 2006), incluyendo como factores aleatorios la jaula de nacimiento de los F3 y además su número de anilla, ya que se obtuvo más de una medida por ave. Los factores fijos fueron la edad (tres medidas), el tipo de ambiente parental y el sexo, analizando también todas las interacciones entre estos. Se introdujeron como covariables potencialmente confundidoras el tamaño de nidada y la fecha de eclosión del padre (calendario juliano). Además, para el análisis de la condición física, al modelo se le añadió el tarso como covariable.

Por otro lado, para comprobar el efecto del ambiente parental de las aves F3 sobre las variables fisiológicas y la intensidad de color rojo del pico, se realizaron diferentes modelos mixtos generalizados, incluyendo como factor aleatorio la jaula de nacimiento de los F3 y la sesión de análisis en el laboratorio cuando se analizó la variabilidad en los parámetros sanguíneos como variables dependientes. Los factores fijos fueron el tipo de ambiente parental y el sexo, analizando también su interacción. Se introdujeron como covariables potencialmente confundidoras el tamaño de nidada, la fecha de eclosión (calendario juliano), la fecha de eclosión del padre y de la madre (calendario juliano), la edad del pájaro cuando se tomó la muestra de sangre para controlar la variabilidad en edad, número de huevos total que puso la madre y la fecha de la puesta del primer huevo de la nidada a la que pertenece el pájaro. La variable concentración de triglicéridos fue transformada en su logaritmo y la variable de MDA en su raíz cuadrada para cumplir el requisito de normalidad. Para el análisis del TAS, al modelo se le añadió el nivel de ácido úrico como covariable. Asimismo para el análisis del MDA, al modelo se le añadió el nivel de triglicéridos como covariable. Se realizaron estos modelos con y sin las variables de ácido úrico y triglicéridos.

Respecto a la personalidad, para reducir la cantidad de variables analizadas y para evitar el uso de múltiples variables correlacionadas en nuestros modelos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Los componentes de los PCA y sus valores propios fueron: orden de captura (0.252), frecuencia respiratoria (0.861), picoteo (0.765), inmovilización tónica (0.763), jerarquía (0.486) y agresividad (0.816). Después de examinar la varianza, seleccionamos dos componentes principales (PCs) con los que trabajar: PC1 con una varianza del 30.3% y el PC2 con el 18.6%. La matriz de componentes de

correlación entre el PC1 y las variables fueron: orden de captura ($r=0.384$), frecuencia respiratoria ($r=0.130$), picoteo ($r=0.859$), inmovilización tónica ($r=0.000$), jerarquía ($r=-0.322$) y agresividad ($r=0.901$). La matriz de componentes de correlación entre el PC2 y las variables fueron: orden de captura ($r=0.320$), frecuencia respiratoria ($r=-0.434$), picoteo ($r=0.086$), inmovilización tónica ($r=0.657$), jerarquía ($r=0.618$) y agresividad ($r=0.065$). Esto sugiere que el PC1 indicaría un comportamiento (eje) que podríamos ir de menor a mayor “agresividad”, mientras que el PC2 podría reflejar mayor o menor “audacia”. Estos PCs fueron usados en análisis posteriores para evaluar las interacciones con covariables morfológicas, fisiológicas y de color con la personalidad de los individuos.

Se analizó el efecto del ambiente parental sobre la variable PC1 y PC2, así como con la inmovilidad tónica debido a su falta de correlación con el PC1. Se realizaron diferentes modelos mixtos generalizados, incluyendo como factor aleatorio la jaula de nacimiento de los F3 y la jaula de grupos de cuatro pájaros donde se encontraban durante el estudio de la personalidad. Los factores fijos fueron el tipo de ambiente parental y el sexo, y su interacción. Se introdujeron como covariables confundidoras las mencionadas anteriormente. La variable de la frecuencia respiratoria fue transformada en su arco tangente y la variable de inmovilización tónica en su logaritmo para cumplir el requisito de normalidad. Las variables del orden de captura, picoteo, jerarquía y agresividad no son normalizables.

Además, para comprobar si existió una interacción en la expresión de la personalidad entre las variables morfológicas, fisiológicas y el color, por un lado, y el ambiente parental, por otro, se analizaron las interacciones entre las citadas covariables morfológicas-fisiológicas-color, el factor ambiente parental y el sexo. Dichos modelos permitieron analizar el impacto del ambiente parental en el perfil fenotípico de los individuos. Los modelos se construyeron tal y como se han descrito los anteriores, solo añadiendo las nuevas interacciones con las covariables.

En todos los modelos se llevó a cabo un ajuste siguiendo un procedimiento de pasos hacia atrás (*backward stepwise procedure*) desde el modelo saturado con el criterio de eliminación de $p<0.10$. Los test post hoc utilizados fueron, *Differences of Least Squares Means (LSD)*. Los valores dados como media \pm ET

fueron calculados a partir de los modelos teniendo en cuenta factores aleatorios y covariables (medias de mínimos cuadrados; *Least Squared Means*, *LSMs*).

3. RESULTADOS:

3.1. Morfología:

Se detectaron diferencias significativas entre ambientes parentales en las variables morfológicas (Figura 5). El peso durante el desarrollo difería entre las aves cuyos padres fueron criados en nidadas aumentadas o reducidas. La interacción entre el tipo de ambiente y la edad fue significativa (ambiente: $F_{1,452}=5.86$, $p=0.016$; edad: $F_{1,452}=1143.57$, $p<0.0001$; ambiente x edad: $F_{1,452}=5.72$, $p=0.0035$). El peso de los pollos no muestra diferencias significativas entre el tipo de ambiente (aumentados: $11.24 \text{ g} \pm 0.21$; reducidos: $10.92 \text{ g} \pm 0.22$; *post hoc* *LSD*: $p=0.29$), mientras que sí se muestran diferencias significativas en aves con 40 días (aumentados: $15.16 \text{ g} \pm 0.21$; reducidos: $14.33 \text{ g} \pm 0.22$; $p=0.0072$) y en aves adultas (aumentados: $15.87 \text{ g} \pm 0.21$; reducidos: $14.93 \text{ g} \pm 0.22$; $p=0.0027$) (Figura 5a). En el mismo modelo, la interacción entre el sexo y la edad fue significativa (sexo: $F_{1,452}=13.85$, $p=0.0002$; edad: $F_{1,452}=1143.57$, $p<0.0001$; sexo x edad: $F_{1,452}=15.54$, $p<0.0001$). Las hembras fueron significativamente más pesadas que los machos cuando eran pollos (hembras: $11.24 \text{ g} \pm 0.18$; machos: $10.92 \text{ g} \pm 0.17$; $p=0.074$) y cuando eran adultos (hembras: $15.97 \text{ g} \pm 0.18$; machos: $14.82 \text{ g} \pm 0.17$; $p<0.0001$), pero no a los 40 días (hembras: $14.80 \text{ g} \pm 0.18$; machos: $14.69 \text{ g} \pm 0.17$; $p=0.55$). Además, la fecha de eclosión del padre de las aves se mantuvo en este modelo ($F_{1,452}=2.85$, $p=0.092$) ya que se observó que los pájaros nacidos de padres más jóvenes tendían a tener menor peso (pendiente: -0.0077 ± 0.0046).

La medida del tarso durante el desarrollo de las aves no tiene diferencias significativas entre ambientes (ambiente: $F_{1,453}=1.25$, $p=0.26$; edad: $F_{1,453}=130.29$, $p<0.0001$; ambiente x edad: $F_{1,452}=1.26$, $p=0.28$).

En el caso de la condición física (peso corregido por tamaño), fueron observados resultados similares a los del peso (ambiente: $F_{1,451}=4.20$, $p=0.041$; edad: $F_{1,451}=769.15$, $p<0.0001$; ambiente x edad: $F_{1,451}=4.91$, $p=0.0077$). La condición física de los pollos no muestra diferencias significativas entre el tipo de ambiente parental (aumentados: 11.42 ± 0.18 ; reducidos: 11.27 ± 0.19 ; $p=0.58$),

mientras que sí se muestran diferencias significativas en aves con 40 días (aumentados: 14.80 ± 0.18 ; reducidos: 14.15 ± 0.19 ; $p=0.013$) y en aves adultas (aumentados: 15.57 ± 0.18 ; reducidos: 14.90 ± 0.19 ; $p=0.012$) (Figura 5b). En el mismo modelo, la interacción entre el sexo y la edad fue significativa (sexo: $F_{1,451}=19.10$, $p<0.0001$; edad: $F_{1,451}=769.15$, $p<0.0001$; sexo x edad: $F_{1,451}=14.18$, $p<0.0001$). Las hembras tenían una condición física significativamente más alta que los machos cuando eran pollos (hembras: 11.50 ± 0.16 ; machos: 11.20 ± 0.15 ; $p=0.062$) y cuando eran adultos (hembras: 15.78 ± 0.16 ; machos: 14.69 ± 0.15 ; $p<0.0001$), pero no a los 40 días (hembras: 14.55 ± 0.16 ; machos: 14.40 ± 0.15 ; $p=0.37$). La medida del tarso también se mantuvo en este modelo ($F_{1,451}=133.77$, $p<0.0001$). Además, se mantuvo el tamaño de nidada ($F_{1,451}=3.41$, $p=0.066$) ya que las aves de nidadas mayores tendieron a tener menor condición física que las aves de nidadas más pequeñas (pendiente: -0.17 ± 0.090).

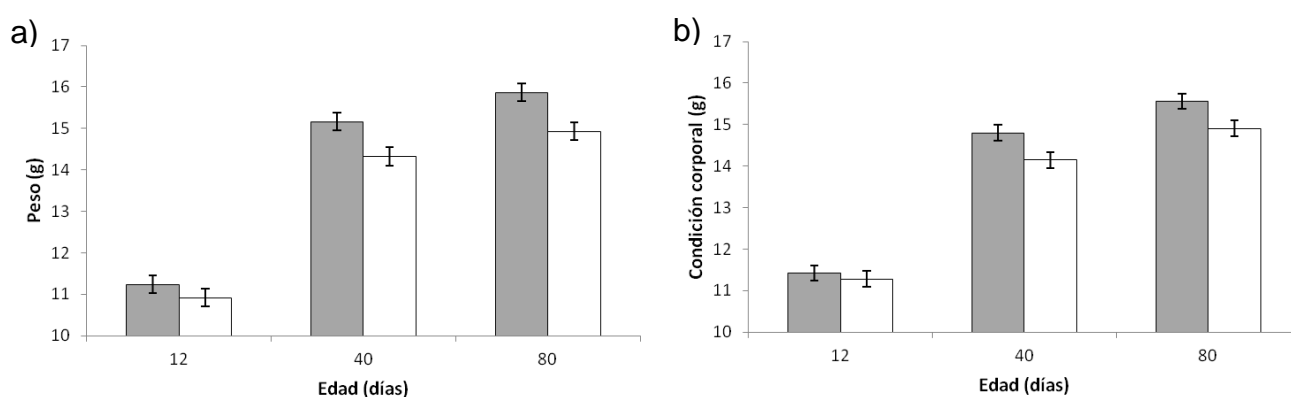


Figura 5: Barra gris: ambiente parental adverso. Barra blanca: ambiente parental propicio.
a) peso a las distintas edades. b) condición física corregida por el tarso a las distintas edades.
Medias y errores estándar calculados a partir de los modelos.

3.2. Fisiología:

El aumento o descenso en el número de pollos de la nidada en la que se criaron los padres no mostró efectos en muchas variables fisiológicas. El ambiente parental no mostró efectos sobre la cantidad de carotenos en la F3 (siempre $p>0.798$), ni en la disponibilidad de antioxidantes no enzimáticos calculada a través del TAS (siempre $p>0.146$), ni en la cantidad de ácido úrico en las aves (siempre $p>0.521$), ni sobre la cantidad de triglicéridos (siempre $p>0.833$), ni sobre la resistencia al estrés oxidativo de los eritrocitos (siempre $p>0.601$), y tampoco tuvo efectos sobre el Lag time (siempre $p>0.311$).

Sin embargo, se detectó un efecto significativo de la interacción del ambiente parental y el sexo en la concentración de MDA plasmático de los pollos (ambiente: $F_{1,163}=0.94$, $p=0.33$; sexo: $F_{1,163}=0.05$, $p=0.82$; ambiente x sexo: $F_{1,163}=5.10$, $p=0.025$). Las hembras de padres de ambiente adverso mostraban menos daño oxidativo que las hembras de ambiente propicio (1.65 ± 0.081 ; $p=1.78 \pm 0.084$ respectivamente), siendo solo las hembras significativas (hembras: $p=0.042$; machos: $p=0.56$) (Figura 6). En este modelo además se mantuvo como covariable la edad que tenía el pollo F3 cuando se le extrajo sangre para el MDA ($F_{1,163}=13.71$, $p=0.0003$; pendiente: 0.057 ± 0.015) y el número de huevos total que puso la madre ($F_{1,163}=3.93$, $p=0.049$; pendiente: -0.021 ± 0.011).

Cuando la variabilidad en MDA fue controlada por la cantidad de lípidos circulantes (triglicéridos) el resultado fue similar (ambiente: $F_{1,158}=0.82$, $p=0.37$; sexo: $F_{1,158}=0.16$, $p=0.68$; ambiente x sexo: $F_{1,158}=4.32$, $p=0.039$). En los test post hoc, el ambiente solo mostró una tendencia a la significación en las hembras (hembras: $p=0.059$; machos: $p=0.59$). Como en el modelo anterior, además se mantuvo como covariable la edad que tenía el pollo F3 cuando se le sacó la muestra de sangre para el MDA ($F_{1,158}=10.53$, $p=0.0014$; pendiente: 0.050 ± 0.015) y el número de huevos total que puso la madre ($F_{1,163}=3.41$, $p=0.066$; pendiente: -0.020 ± 0.010), así como los triglicéridos ($F_{1,158}=20.01$, $p<0.0001$; pendiente: 0.46 ± 0.10).

Por el contrario, el ambiente no mostró un impacto sobre el nivel de MDA en pájaros adultos (siempre $p>0.27$).

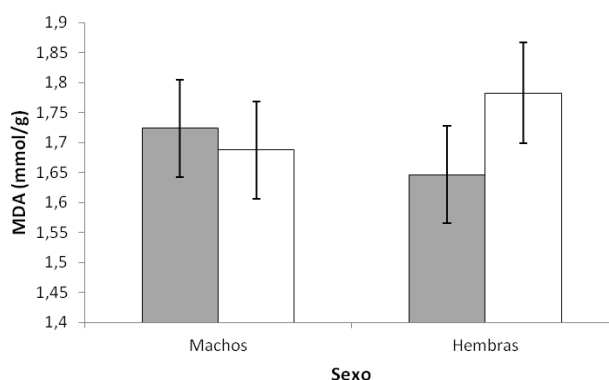


Figura 6: Barra gris: ambiente parental adverso. Barra blanca: ambiente parental propicio. Niveles de MDA plasmático a los 12 días. Medias y errores estándar calculados a partir de los modelos.

También se encontró diferencias en la intensidad de color rojo (inverso del Hue) entre ambientes ($F_{1,159}=4.33$, $p=0.039$). Las aves cuyos padres fueron criados en condiciones adversas mostraron picos más rojos (aumentado: $-0.1113^\circ \pm 0.001177$; reducido: $-0.1149^\circ \pm 0.001221$). En este modelo además se mantuvieron como covariables el sexo ($F_{1,159}=551.65$, $p<0.0001$; los machos son más rojos: -0.099 ± 0.0010 ; hembras: -0.13 ± 0.0010), la fecha de eclosión del pájaro ($F_{1,159}=5.71$, $p=0.018$; pendiente: 0.00085 ± 0.00036) y la fecha de la puesta del primer huevo de la nidada a la que pertenecen ($F_{1,159}=4.57$, $p=0.034$; pendiente: -0.00076 ± 0.00035). Sin embargo, si se obvia que la interacción sexo por ambiente no es significativa ($F_{1,158}=1.31$, $p=0.25$), encontramos un efecto significativo del ambiente en hembras ($p=0.020$), pero no en los machos ($p=0.29$), por lo que las hembras cuyos padres fueron criados en condiciones adversas tienen picos más rojos que hembras cuyos padres se criaron en ambiente propicio (Figura 7).

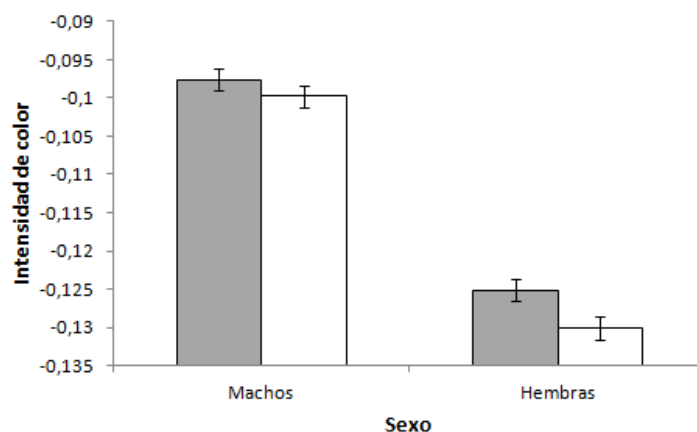


Figura 7: Barra gris: ambiente parental adverso. Barra blanca: ambiente parental propicio. Intensidad de color rojo de la mandíbula superior del pico en los individuos adultos. Medias y errores estándar calculados a partir de los modelos.

3.3. Personalidad y perfil fenotípico:

El ambiente, aumentado o reducido, donde se criaron los padres no es significativo por si solo en ninguna variable de personalidad (factor siempre $p>0.25$). Sin embargo, se han encontrado interacciones significativas entre ambiente y sexo, y con diversas covariables.

Respecto al PC1, los modelos solo detectaron una relación entre éste y el KRL. Los pájaros más agresivos tuvieron unos eritrocitos menos resistentes al estrés oxidativo (i.e. KRL; $F_{1,79}=4.68$, $p=0.033$; pendiente: -0.0185 ± 0.0086)

(Figura 8). El sexo se mantuvo en este modelo ($F_{1,79}=5.50$, $p=0.022$; hembras: 0.126 ± 0.108 ; machos: -0.178 ± 0.108).

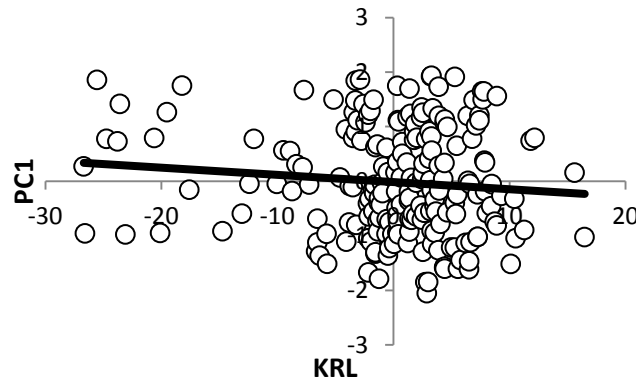


Figura 8: Pájaros con un valor de PC1 más alto tienen eritrocitos menos resistentes.

Si analizamos la inmovilidad tónica por separado y estudiamos su covariación con otros rasgos, observamos un efecto significativo en la interacción con el ambiente, en este caso con el color. Cuando en el modelo se utilizaron los residuos de color corregidos por los factores sexo y fecha de eclosión del individuo (ambiente: $F_{1,84}=0.68$, $p=0.41$; Hue: $F_{1,84}=0.54$, $p=0.46$; ambiente x hue: $F_{1,84}=9.63$, $p=0.0026$). En ambiente parental propicio, las aves más pálidas tardaban más en levantarse (*pendiente*: -32.78 ± 13.61 ; $p=0.026$), y en ambiente adverso lo contrario (*pendiente*: 18.30 ± 10.12 ; $p=0.085$) (Figura 9). En este modelo además se mantuvo como covariable el número de huevos total que puso la madre ($F_{1,84}=5.68$, $p=0.019$; *pendiente*: -0.079 ± 0.033).

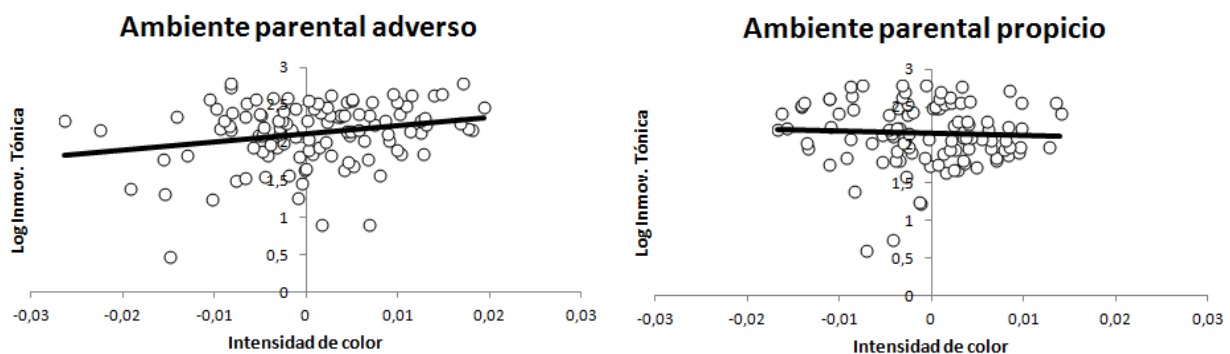


Figura 9: Efecto en el color en el análisis de la inmovilidad tónica.

La interacción entre el ambiente parental y el sexo fue significativa en el caso de la audacia (PC2; ambiente: $F_{1,84}=0.95$, $p=0.33$; sexo: $F_{1,84}=3.72$, $p=0.057$; ambiente x sexo: $F_{1,84}=5.49$, $p=0.021$). Existen diferencias entre sexos, no siendo

significativo el efecto del ambiente en los machos (hembras: $p=0.033$; machos: $p=0.31$), pero si en las hembras, donde aquellas nacidas de padres de ambiente adverso tienen menos PC2 ($p=0.006$) (Figura 10).

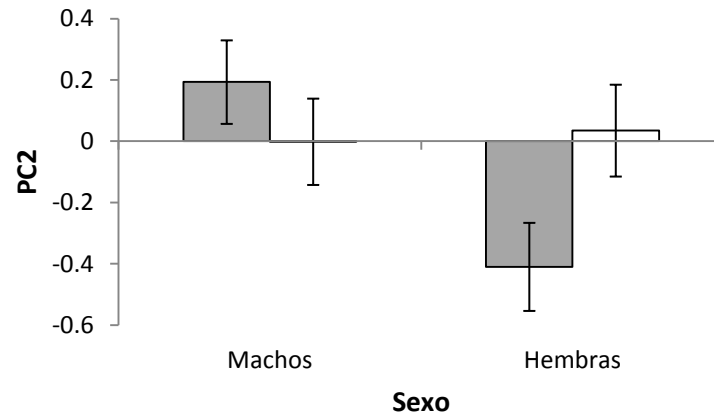


Figura 10: Hembras de padres de ambiente adverso tienen menos PC2. Machos no significativos. Medias y errores estándar calculados a partir de los modelos.

También lo fue la interacción entre el ambiente y condición física (condición física: $F_{1,84}=0.12$, $p=0.73$; ambiente x condición física: $F_{1,84}=15.39$, $p < 0.001$). Entre los de ambiente parental adverso aquellos con menor condición son menos audaces ($F_{1,22}=9.81$, $p=0.005$; pendiente: 0.27 ± 0.088), y entre los de ambiente parental propicio aquellos con menos condición física son más audaces ($F_{1,20}=8.13$, $p=0.010$; pendiente: -0.34 ± 0.12) (Figura 11). En este modelo se mantuvieron también las variables del tamaño de nidada ($F_{1,84}=4.92$, $p=0.029$) ya que las aves de nidadas mayores tendieron a tener menor PC2 que las aves de nidadas más pequeñas (pendiente: -0.126 ± 0.057) y el número de huevos total que puso la madre ($F_{1,84}=3.61$, $p=0.061$; pendiente: -0.059 ± 0.031).

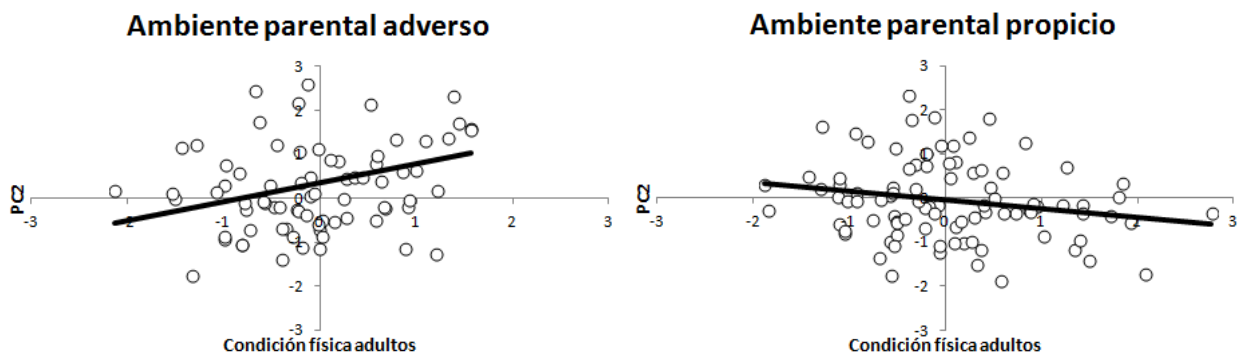


Figura 11: Entre los pájaros de ambiente parental adverso aquellos con más condición física tienen más PC2, y entre los de propicio aquellos con menos condición física tienen más PC2.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos detectado fuertes efectos del ambiente sufrido durante el desarrollo temprano en la siguiente generación de una población cautiva de diamante mandarín. Estos efectos aparecen en diferentes variables morfológicas, fisiológicas, de color y de comportamiento, afectando también a la covariación entre ellas, es decir, al perfil fenotípico de los animales. Las hembras de ambiente parental adverso mostraron un menor daño oxidativo a los 12 días de vida (i.e. menor proporción de grasa circulante oxidada; MDA controlado por triglicéridos). En las siguientes semanas, machos y hembras de ese mismo grupo ganaron más peso durante el desarrollo, y posteriormente, ya como adultos, consiguieron un mayor peso y una mejor condición física (peso corregido por tamaño). Además, esas mismas aves adultas también mostraban señales sexuales más intensas (picos más rojos), el efecto fue nuevamente más fuerte en las hembras. Por último, las mismas hembras mostraron menor audacia durante la manipulación.

Los resultados de las variables fisiológicas y morfológicas en su mayoría contrastan con estudios previos donde el ambiente temprano adverso de los padres tuvo efectos negativos en los hijos (Naguib & Gil 2005, Alonso-Álvarez et al 2007b; Griffith & Buchanan 2010). Se podría pensar que los efectos negativos del ambiente temprano sufrido por los padres los programó para vivir en condiciones difíciles, de alta competencia por el alimento, por lo tanto, criaron a sus hijos como si el ambiente no hubiera cambiado. Sin embargo la reproducción de las aves F2 se hizo en mejores condiciones que las que encontraron durante su crecimiento, ya que en esta ocasión las aves fueron mantenidas en aviarios interiores, con temperatura controlada y cobijo de la meteorología. Además, se les permitió ajustar el tamaño de nidada a sus capacidades para criar más o menos hijos (no se intercambiaron pollos). En resumen, que las condiciones fueron teóricamente propicias para todos. El resultado fue que, con independencia del tamaño de nidada, las aves de padres criados en condiciones adversas fueron más pesadas, más coloreadas y tuvieron mejor “condición física” de adultas. Esto podría sugerir que los hijos de ambiente parental adverso fueron mejores, pero tal vez esos rasgos fenotípicos no estarían bien adaptados a un ambiente pródigo en recursos.

En humanos y en modelos de roedores se habla de “*fenotipo ahorrador*” cuando unas condiciones nutricionales adversas durante el desarrollo fetal producen hijos que, cuando son adultos, tienden a almacenar energía (grasas) como medio de adaptación a futuras condiciones adversas (“*thrifty phenotype*”; Wells 2007). Cuando dichas condiciones no son adversas, dicha programación se vuelve en contra, provocando diversas enfermedades, como obesidad, diabetes y patologías vasculares (Wells 2007; Stöger 2008; Ponzio et al. 2012). Monaghan (2008) redefinió esta idea como la hipótesis del “*ajuste fenotípico al ambiente*”. Hay que pensar que un exceso de peso podría suponer un coste para el vuelo (Jones 1994; Boyle et al 2012). Los padres de diamante no solo habrían programado a sus hijos para almacenar reservas, sino también a reproducirse pronto, si consideramos que un color más intenso (señal sexual) favorecería sus opciones de reproducirse a corto plazo (Simons & Verhulst 2011). Curiosamente, Price y Burley (1994) mostraron que las hembras de diamante con picos más rojos sobrevivían peor, aunque recientemente Simons et al (2012) rechazaron esta idea en una muestra más grande de aves, mostrando que hembras más rojas también producían más hijos durante su vida, aunque la medición de color se hizo a edades mucho más avanzadas.

El menor daño oxidativo transitorio de las hembras a los 12 días sugiere que algún cambio positivo tuvo lugar en la fisiología de este sexo permitiéndoles soportar mejor el estrés oxidativo del desarrollo (p.ej. Alonso-Alvarez et al 2007b). Sin embargo, está ampliamente demostrada la mayor susceptibilidad de las aves hembra a ambientes adversos con respecto a los machos (en diamante mandarín: Naguib et al 2005; Verhulst et al 2006, Alonso-Alvarez et al 2007c). Se puede sugerir así que los padres crecidos en ambientes adversos disminuyeron de alguna forma el daño oxidativo en los hijos más sensibles (hijas) con el fin de prepararlos para un ambiente perjudicial. Un mecanismo probable de dicho ajuste sería una mayor asignación de antioxidantes, tales como carotenoides (Pérez-Rodríguez 2009), en la yema del huevo (p.ej. Royle et al. 2001). El color rojo del pico de estas aves está también creado por carotenoides (McGraw et al. 2010). El hecho de un mayor efecto en las hembras puede sugerir que un menor daño oxidativo temprano les haya permitido posteriormente redistribuir carotenoides hacia la coloración, o bien que una mayor capacidad de almacenar grasa pudiera haberles facilitado la absorción de carotenoides (García de Blas et al. 2013), los

cuales son liposolubles y dependen de la grasa para su absorción (McGraw 2006). Sin embargo, no detectamos diferencias entre ambientes en los niveles circulantes de carotenoides o triglicéridos.

Por otro lado, en cuanto a la personalidad, y en concreto, a la agresividad (PC1), no se observó ninguna interacción con el ambiente, ni entre este último y ninguna covariable, pero las aves más agresivas mostraron menor resistencia al estrés oxidativo (i.e. KRL). Dicha relación podría estar mediada por la testosterona, ya que los niveles de esta hormona están relacionados positivamente con la agresividad en numerosas especies (Nelson 1996), y se ha visto que machos de diamante tratados con esta hormona mostraban una menor resistencia al estrés oxidativo medido de la misma manera que en este estudio (Alonso-Álvarez et al 2007a). Según este último trabajo, la testosterona aumentaría las tasas metabólicas, incrementando la formación de moléculas pro-oxidantes, lo que llevaría a un desequilibrio y a un mayor estrés oxidativo (ver también Peters et al 2007).

Para concluir con los rasgos individuales, las hembras de ambiente parental adverso fueron también menos audaces (PC2). Este PC recoge sobre todo un efecto de la inmovilidad tónica independiente de la agresividad (PC1). La inmovilidad tónica ha sido interpretada como el comportamiento de hacerse el muerto delante de un depredador (Cockrem 2007; Brust et al 2013; Henriksen et al. 2013). Este comportamiento es adaptativo, porque aquellos individuos que permanecen tumbados más tiempo incrementan su supervivencia ante un depredador, en parte por desviación de la atención de ese depredador hacia otras presas (Cockrem 2007; Brust et al 2013; Henriksen et al. 2013). Un apoyo importante a la idea de audacia es que nuestro PC2 muestra una correlación negativa con la frecuencia respiratoria, es decir, que las aves más inmóviles respiraban más lento. De hecho se ha propuesto que un animal que está siendo manipulado y tiene baja frecuencia respiratoria no está estresado (Carere & Oers 2004). Por ello, una menor audacia en las hembras de ambiente parental adverso podría apoyar la idea de un desajuste entre el ambiente esperado (programado) por los padres y el ambiente experimentado finalmente. Los padres habrían primado la inversión en reservas y reproducción temprana en las hijas a expensas de un comportamiento de evitar predadores (supervivencia).

Cuando analizamos los perfiles fenotípicos, entre los pájaros de ambiente parental adverso de cualquier sexo aquellos de peor condición física y más pálidos mostraron una menor audacia (PC2) y menor inmovilidad tónica, respectivamente (Figuras 9 y 11). Por el contrario, los pájaros de peor condición y más pálidos, pero de ambiente parental propicio, mostraron mayor audacia e inmovilidad. Si asumimos causalidad, podríamos decir que entre las aves de ambiente parental adverso el ser menos audaz limita tu capacidad de obtener y, por tanto, distribuir carotenoides al pico. Mientras, las aves de ambiente parental propicio ambos rasgos se compensarían, siendo los pálidos más audaces. El ambiente parental adverso supondría así una limitación a la plasticidad en ambos sexos (un “*constraint*”; West-Eberhard 2003; Monaghan 2008).

Con todos estos resultados podemos confirmar la hipótesis de que las condiciones sufridas durante el desarrollo temprano en una generación pueden afectar a caracteres fenotípicos diversos de la siguiente generación, morfológicos, fisiológicos y personalidad. Los resultados en su conjunto sugieren que los cambios observados en los descendientes podrían ser adaptativos, pero en ciertas circunstancias. No obstante, queda por estudiar los efectos sobre la supervivencia de esas aves, a día de hoy gozando de buena salud. Por otra parte, en el futuro se pretende determinar la influencia que ha tenido la generación anterior (F1) en la transmisión de todos estos efectos. Dicha generación fue manipulada durante su desarrollo, alterando su maquinaria antioxidante (ver apartado de Material y métodos).

5. CONCLUSIONES

1. En los diamantes mandarines las condiciones tempranas de vida determinan diferentes rasgos morfológicos, fisiológicos y de personalidad de la descendencia.
2. Los descendientes de padres que han sufrido un ambiente adverso durante su desarrollo son más pesados y muestran una señal sexual más intensa que los descendientes de padres que han disfrutado de un ambiente propicio.

3. Existen diferencias entre sexos en la susceptibilidad al ambiente parental temprano, siendo las hembras las que muestran más efectos significativos, mostrando menor daño oxidativo durante el crecimiento y siendo menos audaces de adultas.
4. El fenotipo creado por el ambiente parental adverso parece ajustarse a un perfil de inversión en reproducción temprana, pero en el caso de las hembras, a expensas de la supervivencia frente a depredadores.
5. Las condiciones adversas parentales también parecen haber afectado a la capacidad de ajustar el comportamiento antidepredador al estado de condición individual (peso y coloración).
6. La eficacia biológica del nuevo fenotipo dependerá del ambiente que se encontrará durante su vida, el resultado de dicho ajuste siendo tal vez subóptimo en condiciones de cautividad.

6. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Carlos Alonso y a Ana Ángela Romero por darme la oportunidad de realizar este proyecto y colaborar con su grupo de investigación, además de su gran ayuda, paciencia y dedicación a lo largo de todo este estudio. La financiación del estudio se realizó mediante el proyecto de investigación CGL-2009-10883-C02-02.

También agradecer a Ester Ferrero, Esther García y Laura Ramírez, por su ayuda en el trabajo de laboratorio, y al personal de la Finca Galiana (Universidad de Castilla – La Mancha), en especial a Fernando Dueñas por su apoyo en el mantenimiento del aviario.

Por último a mis compañeros del máster: Pizki, Kike, Marinela, Mari Cruz y Sonia *¡sobrevivimos juntos!*

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, R., Chase, S.D. 2002 Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 775, 121-126.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Chastel, O., Sorci, G. 2006 An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress. *Evolution*, 60, 1913-1924.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G. 2004 Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters*, 7, 363-368.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Faivre, B., Chastel, O., Sorci, G. 2007a Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B*, 274, 819-825.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Faivre, B., Sorci, G. 2007b Increased susceptibility to oxidative damage as a cost of accelerated somatic growth in zebra finches. *Functional Ecology*, 21, 873-879.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Sorci, G. 2007c Sex-specific transgenerational effects of early developmental conditions in a passerine. *Biological Journal of the Linnean Society*, 91, 469-474.
- Auer, S.K. 2010 Phenotypic plasticity in adult life-history strategies compensates for a poor start in life in trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *The American Naturalist*, 176, 6, 818-29.
- Boyle, W.A., Winkler, D.W., Guglielmo, C.G. 2012 Rapid loss of fat but not lean mass prior to chick provisioning supports the flight efficiency hypothesis in tree swallows. *Functional Ecology*, 26, 4, 895-903.
- Brust, V., Wuerz, Y., Krüger, O. 2013 Behavioural flexibility and personality in zebra finches. *Ethology*, 119, 559-569.
- Burley, N., Coopersmith, C.B. 1987 Bill color preferences of zebra finches. *Ethology*, 76, 133-151.
- Carere, C., van Oers, K. 2004 Shy and bold great tits (*Parus major*): body temperature and breath rate in response to handling stress. *Physiology & Behavior*, 82, 905-912.

- Carter, A.J., Feeney, W.E., Marshall, H.H., Cowlshaw, G., Heinsohn, R. 2013 Animal personality: what are behavioural ecologists measuring? *Biological Reviews*, 88, 465-475.
- Chiu D., Lubin B., Shahet S.B. 1982 Peroxidative reactions in red cell biology. En W.A. Pryor (ed.). *Free radical in biology*. Vol. 5. Academic Press, New York. pp, 115- 160.
- Cockrem, J.F. 2007 Stress, corticosterone responses and avian personalities. *Journal ornithology*, 148, 169-178.
- Cohen, A., Klasing, K., Ricklefs, R. 2007 Measuring circulating antioxidants in wild birds. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147, 110-121.
- Crews, D., Gore, A.C., Hsu, T.S., Dangleben, N.L., Spinetta, M., Schallert, T., Anway, M.D., Skinner, M.K. 2007 Transgenerational epigenetic imprints on mate preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 14, 5942-5946.
- De Coster, G., Verhulst, S., Koetsier, E., De Neve, L., Briga, M., Lens, L. 2011 Effects of early developmental conditions on innate immunity are only evident under favourable adult conditions in zebra finches. *Naturwissenschaften* 98, 1049-1056.
- Dowling, D.K., Simmons, L.W. 2009 Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B.*, 276, 1737-1745.
- Drent, P.J., van Oers, K., van Noordwijk, A.J. 2003 Realized heritability of personalities in the great tit (*Parus major*). *Proceedings of the Royal Society B*. 270, 45-51.
- Finkel, T., Holbrook, N.J. 2000 Oxidants, oxidative stress, and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-247.
- Fox, R.A., Millam, J.R. 2004 The effect of early environment on neophobia in orange-winged Amazon parrots (*Amazona amazonica*). *Animal Behaviour Science* 89, 117-129.
- Fucikova, E., Drent, P. J., Smits, N., Van Oers, K. 2009 Handling stress as a measurement of personality in great tit nestlings (*Parus major*). *Ethology*, 115, 366-374.
- Garcia-de Blas, E., Mateo, R., Vinuela, J., Perez-Rodriguez, L., Alonso-Alvarez, C. 2013 Free and Esterified Carotenoids in Ornaments of an

- Avian Species: The Relationship to Color Expression and Sources of Variability. *Physiological and Biochemical Zoology*, 86, 483-498.
- Griffith, S.C., Buchanan, K.L. 2010 Maternal effects in the zebra finch: a model mother reviewed. *EMU*, 110, 251-267.
 - Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2007 Free radicals in biology and medicine, 4th edn. Oxford, UK: Oxford University Press.
 - Hargitai, R., Arnold, K.E., Herenyi, M., Prechl, J., Török, J. 2009 Egg composition in relation to social environment and maternal physiological condition in the collared flycatcher. *Behavioral Ecology*, 63, 869-882.
 - Henriksen, R., Rettenbacher, S., Groothuis, T.G.G. 2013 Maternal corticosterone elevation during egg formation in chickens (*Gallus gallus domesticus*) influences offspring traits, partly via prenatal undernutrition. *General and Comparative Endocrinology*, 191, 83–91.
 - Herborn, K.A., Coffey, J., Larcombe, S.D., Alexander, L., Arnold, K.E. 2011 Oxidative profile varies with personality in European greenfinches. *The Journal of Experimental Biology*, 214, 1732-1739.
 - Jones, I.L. 1994 Changes of least auklets *Aethia pusilla* during the breeding season. Evidence for programmed loss of mass. *Journal of Animal Ecology*. 63, 1, 71-78.
 - Jones, R.B. 1986 The tonic immobility reaction of the domestic fowl: a review. *World's Poultry Science Journal*, 41, 82-96.
 - Jones, R.B., Faure, J.M. 1981 Sex and strain comparisons of tonic immobility ("righting time") in the domestic fowl and the effects of various methods of induction. *Behavioral Process*, 6, 47-55.
 - Ledón-Rettig C.C., Richards C.L., Martin L.B. 2013 Epigenetics for behavioral ecologists. *Behavioral Ecology*, in press. Doi: 10.1093/beheco/ars145.
 - Lessells C.M., Boag P.T. 1987 Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *Auk*, 104, 116-121.
 - Littell, R.C., Milliken G.A., Stroup W.W., and Wolfinger R.D. 2006 SAS system for mixed models. Second edition. SAS Institute, Cary, NC.
 - Maestriperi, D., Mateo, J.M. 2009 The role of maternal effects in mammalian evolution and adaptation. Chicago: The University of Chicago Press.

- Mainwaring, M. C., Hartley, I.R. 2013 Hatching asynchrony and offspring sex influence the subsequent exploratory behaviour of zebra finches. *Animal Behaviour*, 85, 77-81.
- McGraw, K.J. 2006 Mechanics of melanin-based coloration. *Bird coloration: Mechanisms and Measurements*. G.E. Hill & K.J. McGraw, 243-294.
- McGraw, K.J., Toomey, M.B. 2010 Carotenoid accumulation in the tissues of zebra finches: predictors of integumentary pigmentation and implications for carotenoid allocation strategies. *Physiological and Biochemical Zoology*, 83, 97-109.
- Metcalfe, N.B., Alonso-Alvarez, C. 2010 Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Functional Ecology*, 24, 984-996.
- Metcalfe, N.B., Monaghan, P. 2001 Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 254-260.
- Miki, M., Tamai, H., Mino, M., Yamamoto, Y., Aiki E. 1987 Free radical chain oxidation in rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by α -tocopherol. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 258, 373-380.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. 1993 A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 84, 407-412.
- Monaghan, P. 2008 Early growth conditions, phenotypic development and environmental change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363, 1635-1645.
- Monaghan, P., Heidinger, B.J., D'Alba, L., Evans, N.P., Spencer, K.A. 2011 For better or worse: reduced adult lifespan following early-life stress is transmitted to breeding partners. *Proceedings of the Royal Society B*, 279, 1729, 709-714.
- Monaghan, P., Metcalfe, N.B., Torres, R. 2009 Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*, 12, 75-92.
- Morgan, D., Auclair, Y., Cézilly, F. 2012 Assessing short- and long-term repeatability and stability of personality in captive zebra finches using longitudinal data. *Ethology*, 118, 932-942.

- Mousseau, T.A., Fox, C.W. 1998 Maternal effects as adaptations. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Naguib, M., Gil, D. 2005 Transgenerational effects on body size caused by early developmental stress in zebra finches. *Biology Letters*, 1, 95-97.
- Naguib, M., Nemitz, A., Gil, D. 2006 Maternal developmental stress reduces
- Nelson, R.J. 1996 An introduction to behavioral endocrinology. Sinauer Associates Inc
- Noguera, J.C., Lores, M., Alonso-Álvarez, C., Velando, A. 2011 Thrifty development: early-life diet restriction reduces oxidative damage during later growth. *Functional Ecology*, 25, 1144-1153.
- Nussey, D.H., Pemberton, J.M., Pilkington, J.G., Blount, J.D. 2009 Life history correlates of oxidative damage in a free-living mammal population. *Functional Ecology*, 23, 809-817.
- Pérez-Rodríguez, L. 2009 Carotenoids in evolutionary ecology: re-evaluating the antioxidant role. *Bioessays*, 31, 1116-1126.
- Peters, A. 2007 Testosterone and carotenoids: an integrated view of trade-offs between immunity and sexual signalling. *BioEssays*, 29, 5, 427-430.
- Pieri, C., Moroni, F., Marra, M. 1996 Food restriction increases the protection of erythrocytes against the hemolysis induced by peroxy radicals. *Mechanisms of Ageing and Development*, 87, 15-23.
- Pigliucci, M. 2003 Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecology Letters*, 6: 265-272.
- Ponzio, B.F., Carvalho, M.H., Fortes, Z.B., do Carmo, F.M. 2012 Implications of maternal nutrient restriction in transgenerational programming of hypertension and endothelial dysfunction across F1-F3 offspring. *Life Sciences*, 90, 571-577.
- Price, D.K., Burley, N.T. 1994 Constraints on the Evolution of Attractive Traits Selection in Male and Female Zebra Finches. *American Naturalist*, 144, 908-934.
- Réale, D., Reader, S.M., Sol, D., McDougall, P.T., Dingemanse, N.J. 2007 Review Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews*, 82, 291-318.
- reproductive success of female offspring in zebra finches. *Proceedings of the Royal Society B*, 273, 1901-1905.

- Rödel, H.G., Meyer, S. 2011 Early development influences ontogeny of personality types in young laboratory rats. *Developmental Psychobiology*, 53, 601-613.
- Royle, N.J., Surai, P.F., Hartley, I.R. 2001 Maternally derived androgens and antioxidants in bird eggs: complementary but opposing effects? *Behavioral Ecology*, 12, 381-385.
- Ruuskanen, S., Laaksonen, T. 2010 Yolk hormones have sex-specific long-term effects on behavior in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Hormones and Behavior*, 57, 119-127.
- Schoech, S.J., Rensel, M.A., Wilcoxon, T.E. 2012 Here today, not gone tomorrow: long-term effects of corticosterone. *Journal of Ornithology*, 153, 217-226.
- Shimada, M., Ishii, Y., Shibao, H. 2010 Review Rapid adaptation: a new dimension for evolutionary perspectives in ecology. *Population Ecology*, 52, 5-14.
- Sih, A., Bell, A., Johnson, J.C. 2004 Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 372-378.
- Sih, A., Bell, A., Johnson, J.C. 2011 Behavioral syndromes. *Evolutionary Behavioural Ecology*. Pp. 516-530. Oxford Univ Press.
- Simons, M.J.P., Briga, M., Koetsier, E., Folkertsma, R., Wubs, M.D., Dijkstra, C., Verhulst, S. 2012 Bill redness is positively associated with reproduction and survival in male and female zebra finches. *PLoS One*, 7:e40721.
- Simons, M.J.P., Verhulst, S. 2011 Zebra finch females prefer males with redder bills independent of song rate-a meta-analysis. *Behavioral Ecology*, 22, 755-762.
- Smith, B.R., Blumstein, D.T. 2008 Fitness consequences of personality: a meta-analysis. *Behavioral Ecology*, 19, 448-455.
- Stamps, J., Groothuis, T.G.G. 2010 The development of animal personality: relevance, concepts and perspectives. *Biological Reviews*, 85, 301-325.
- Stocker, P., Lesgards, J.F., Vidal, N., Chalier, F., Prost, M. 2003 ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1621, 1-8.

- Stöger, R. 2008 The thrifty epigenotype: an acquired and heritable predisposition for obesity and diabetes? *BioEssays* 30, 2, 156-66.
- Tobler, M., Sandell, M.I. 2007 Yolk testosterone modulates persistence of neophobic responses in adult zebra finches, *Taeniopygia guttata*. *Hormones and Behavior*, 52, 640–645.
- Torrens, C., Poston, L., Hanson, M.A. 2008 Transmission of raised blood pressure and endothelial dysfunction to the F2 generation induced by maternal protein restriction in the F0, in the absence of dietary challenge in the F1 generation. *British Journal of Nutrition*, 100, 4, 760-6.
- Van den Brink, V., Dolivo, V., Falourd, X., Dreiss, A. N. & Roulin, A. 2012 Melanic colour-dependent antipredator behavior strategies in barn owl nestlings. *Behavioral Ecology*, 23, 473-480.
- van den Brink, V., Henry, I., Wakamatsu, K., Roulin, A. 2012 Melanin-based coloration in juvenile kestrels (*Falco tinnunculus*) covaries with anti-predatory personality traits. *Ethology*, 118, 673-682.
- Velando, A., Torres, R., Alonso-Alvarez, C. 2008 Avoiding bad genes: oxidatively damaged DNA in germ line and mate choice. *BioEssays*, 30, 1212-1219.
- Verhulst, S., Holveck M.J., Riebel, K. 2006 Long-term effects of manipulated natal brood size on metabolic rate in zebra finches. *Biology Letters*, 2, 478-480.
- Wells, J.C. 2007 The thrifty phenotype as an adaptive maternal effect. *Biological Reviews*, 82, 143-72.
- West-Eberhard, M.J. 2003 *Developmental Plasticity and Evolution*. New York: Oxford University Press.
- Wolf, M., Weissing, F.J. 2012 Animal personalities: consequences for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 27, 452-461.
- Zann, R. 1996 *The Zebra Finch: A synthesis of field and laboratory studies*. Oxford, UK: Oxford University Press.